研究用試薬

再構成無細胞タンパク質合成キット

PURESYSTEM® classic II

取扱説明書

96	PURE2048C
standard	PURE2030C
mini	PURE2004C

BioComber
バイオコゥマー株式会社

・本キットは研究目的に製造されているため，その他の目的には使用できません。
・キットの内容は予告なく変更される可能性があります。

安 全 情 報

Sol. A 及び Sol. B には 1%未満のジチオスレイトールが含まれています。その他，表記すべき危険性のある物質は含まれていません。本キットで合成したタンパク質やペプチドが強い毒性や病原性を持つことが想定される場合などは手袋，眼鏡などの安全器具を着用して使用してください。

反応液などが皮膚に付着したり眼にかかった場合は，速やかに水道水で洗浄してください。また，必要な場合は医師に相談しその指示に従ってください。試薬の廃棄に関しましては，国や自治体，所属施設などの定める法律，条令，規則などに従ってください。

目　次

1. クイックプロトコル （タンパク質合成反応）

1. Sol. A および Sol. B を氷上で融解します。

2. 新しい反応チューブを用意し，氷上で以下のように反応液を調製します。

		96 / mini	standard
□	Nuclease-free Water	μl	μl
□	Sol. A	25 μl	500 μl
□	Sol. B	10 μl	200 μl
□	Template DNA	μl*1	μl*2
	Total	50 μl	1000 μl

*1; 1 pmol PCR product or 0.5 μg plasmid DNA

*2; 20 pmol PCR product or 10 μg plasmid DNA

3. 泡立てないように混ぜ，軽く遠心して反応液をチューブの底に集めます。

4. 37 °C で 1 時間反応します。

5. 反応チューブを氷上に戻します。

6. 合成したタンパク質の精製，および解析を行ないます。

2. キットの内容

2-1. PURESYSTEM® classic II 96 (Prod.#PURE2048C)

50 µl での合成反応を 96 回行なうために必要な試薬が含まれます。

ラベル（チューブ色）	内　容
Sol. A (黄色)	96 x 25 µl
Sol. B (赤色)	96 x 10 µl
Temp. DHFR (青色)	2 x 5 µl
Univ. Primer (無色)	2 x 500 µl

2-2. PURESYSTEM® classic II standard (Prod.#PURE2030C)

1 ml での合成反応を 3 回行なうために必要な試薬が含まれます。

ラベル（チューブ色）	内　容
Sol. A (黄色)	3 x 500 µl
Sol. B (赤色)	3 x 200 µl
Temp. DHFR (青色)	1 x 50 µl
Univ. Primer (無色)	1 x 80 µl

2-3. PURESYSTEM® classic II mini (Prod.#PURE2004C)

50 µl での合成反応を 8 回行なうために必要な試薬が含まれます。

ラベル（チューブ色）	内　容
Sol. A (黄色)	8 x 25 µl
Sol. B (赤色)	8 x 10 µl
Temp. DHFR (青色)	1 x 5 µl
Univ. Primer (無色)	1 x 80 µl

・Sol. A および Sol. B は使用直前に融解し，再凍結は避けてください。
・Temp. DHFR は，ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子を含むプラスミド DNA（0.2 µg/µl）です。タンパク質合成反応のポジティブコントロールとして使用してください。
・Univ. Primer は 2 段階 PCR における 2 段階目の際の Forward プライマーとして使用してください。また，Univ. Primer の濃度は 2 µM です。

3. キットの保存方法

キットは-80 °C で保存してください。また，融解後の再凍結は避けてください。

4. PURESYSTEM について

4-1. PURESYSTEM とは？

PURESYSTEMは，東京大学大学院の上田卓也教授のグループにより開発された世界初の再構成無細胞タンパク質合成技術で，転写，翻訳およびエネルギー再生に必要な 36 のタンパク質因子を全て別々に調製，精製後，再構成したものです[1)]。転写・翻訳に必要な因子として，大腸菌の翻訳因子である開始因子（IF1，IF2，IF3），伸長因子（EF-Tu，EF-Ts，EF-G），終結因子（RF1，RF2，RF3），リボソームリサイクリング因子，20 種類のアミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素，メチオニルtRNAホルミル転移酵素，大腸菌 70Sリボソーム，および転写酵素としてT7 RNAポリメラーゼを含みます。その他，大腸菌tRNA，アミノ酸，NTP，エネルギー再生系などを含んでいます。**PURESYSTEM**によるタンパク質の合成は，反応液に目的タンパク質のテンプレートDNAを添加するだけです。
リボソームタンパク質以外の構成タンパク質は，すべてヒスチジンタグを N 末端もしくは C 末端に付加した状態で調製されています。また，**PURESYSTEM** には未確認のタンパク質が含まれていません。そのため，目的タンパク質の合成終了後，限外ろ過膜を使用してリボソームを，また金属アフィニティー樹脂を使用してヒスチジンタグ付加因子をそれぞれ反応系から除去することで，合成タンパク質を迅速に精製することが可能です。（図 1）
*1) Shimizu Y., et al., (2001) *Nature Biotechnology*, vol.19, p.751-755.

4-2. PURESYSTEM の特長

<u>高純度の反応液で合成可能</u>

精製した因子を再構成した反応系のため，タンパク質合成に無関係なタンパク質が含まれていません。また，プロテアーゼ，ヌクレアーゼなど合成反応を阻害する因子の混入も非常に少ないため，合成産物の分解がほとんど起こりません。

<u>タグなしのタンパク質を合成・精製可能</u>

転写・翻訳因子など反応液に含まれるリボソームタンパク質以外のタンパク質にはヒスチジンタグが付加されているため，これらの因子は，タンパク質合成反応終了後に金属アフィニティー樹脂により除去することが可能です。

<u>短時間でタンパク質を合成・精製可能</u>

図1に示す簡易精製の場合，わずか 3 ステップで合成・精製が完了します。実際の操作時間は 10 分で，反応および遠心の時間を合わせて合成開始から約 3 時間で精製完了です。

合成反応液のカスタマイズが可能 （PURESYSTEM custom）

精製因子を再構成した合成反応液のため，実験や使用目的にあわせて反応液の組成を変更することが可能です。例えば，終結因子を含まない反応液で合成反応を行なうと，合成されたペプチド鎖がリボソームから解離していない複合体を回収することができます。また，界面活性剤，補因子などを添加して合成反応を行なうことも可能です。さらに，分子シャペロンや修飾酵素などを反応液に添加することによって，合成後のタンパク質の高次構造を安定化したり，酵素活性を上昇させることもできます。

PURESYSTEM custom の詳細については，info@biocomber.co.jpまでお問い合わせください。

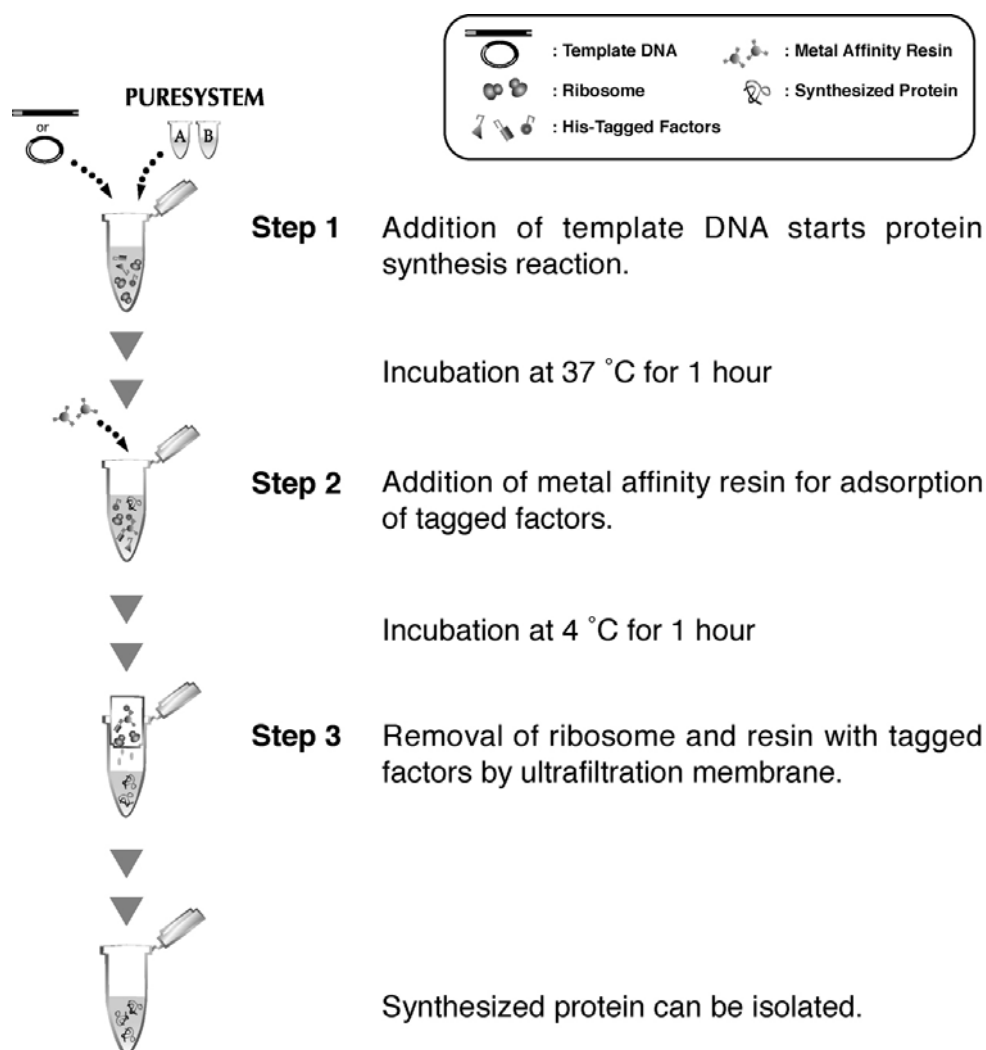



図 1） **PURESYSTEM** によるタンパク質合成・精製の概略

5. 操作手順

5-1. テンプレート DNA の調製

5-1-1. テンプレート DNA について

PURESYSTEM によるタンパク質合成では，テンプレート DNA として PCR 産物およびプラスミド DNA のどちらも使用できます。ただし，以下の配列を含んでいる必要があります。

・開始コドン（ATG）
・終止コドン（TAG, TGA, TAA のいずれか）
・遺伝子の上流に T7 プロモーター
・開始コドンの約 10 塩基上流にリボソーム結合部位（SD 配列）
・PCR 産物の場合は，終止コドンの下流に 6 塩基以上（転写ターミネーター配列は必要ありません）
・プラスミド DNA の場合は，終止コドンの下流に転写ターミネーター配列

PURESYSTEM の特長を生かす上で,下記の理由から PCR 産物の使用をお勧めします。

・PCR 産物を精製することなく，PCR 反応液を直接 **PURESYSTEM** の反応液に加えることができます。
・面倒な発現ベクターへの導入の手間が必要ありません。
・多種類のテンプレート DNA を一度に調製することができます。
・遺伝子配列の改変が容易です。
　例) 欠失，点変異，複数の部分配列への分割，タグ配列の導入など

5-1-2. PCR 産物の調製

テンプレート DNA は，2 段階 PCR で調製することをお勧めします。（図 2）
1 段階目の PCR で，目的の遺伝子の 5'側にアダプター配列を導入します。そして，2 段階目の PCR で T7 プロモーター配列を含む領域を付加します。このような 2 段階 PCR ではなく，すべての制御領域を含むプライマーを用いて，1 段階の PCR でテンプレート DNA を調製することも可能です。
テンプレート DNA を PCR で調製する際は，正確性の高い酵素を使用してください。
以下に 2 段階 PCR によるテンプレート DNA の調製法を示します。

1. Forward プライマーと Reverse プライマーを図 2 および表 1 を参考に設計します。
2. 目的の遺伝子を含む DNA を鋳型とし，1.で設計したプライマーを用いて 1 段階目の PCR を行ないます。
3. PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認します。単一のバンドとして検出される場合は，1 段階目の PCR 反応液の希釈液を直接 2 段階目の PCR の鋳型として用いること

が可能です。目的のPCR産物の他に副産物が確認された場合などは，PCRの条件を検討するか，もしくは目的のPCR産物をアガロースゲルから回収してください。

4. 1段階目のPCR産物を鋳型として，キットに添付されているUniversalプライマー（Univ. Primer）と1.で設計したReverseプライマーを用いて2段階目のPCRを行ないます
5. PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認します。2段階目のPCR産物は1段階目より約70塩基長くなります。目的産物のみが正しく増幅されているときは，PCR反応液を直接，**PURESYSTEM**でのタンパク質合成のテンプレートDNAとして使用できます。

表1）プライマー配列

primer	sequence
Forward primer	5'-AAGGAGATATACCA-ATG-$N_{14\text{-}20}$-3'
Reverse primer	5'-TATTCA-TTA-$N_{14\text{-}20}$-3'
Universal primer (Univ. Primer)	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCC CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA-3'

5-1-3. プラスミドDNAをテンプレートDNAとして使用する場合の注意点

テンプレートDNAとして，プラスミドDNAを使用する場合は，以下の点にご注意ください。

- 発現ベクターは，T7プロモーター配列，リボソーム結合部位，転写ターミネーター配列を含むベクターを使用してください。
- 転写ターミネーター配列を含まない場合は，終止コドンの下流で制限酵素により切断した直鎖状DNAを使用してください。
- 市販のプラスミドDNA精製キットのなかで，**PURESYSTEM**のテンプレートDNAの調製には適さないものが報告されています。詳細は，テクニカルサポートにお問い合わせください。
- 使用するプラスミドDNAは，RNaseフリー水，もしくはEDTAを含まないバッファーに溶解してください。EDTAは，**PURESYSTEM**でのタンパク質合成反応を阻害する可能性があります。
- RNAは除去してください。RNaseを使用した場合は，RNaseをフェノール処理などで完全に失活させてください。
- ヒスチジンタグを付加させる発現ベクターに目的遺伝子を導入した場合，本マニュアルに記載してある簡易精製は使用できません。

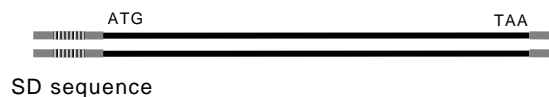
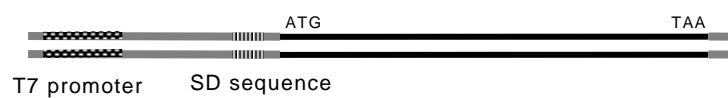
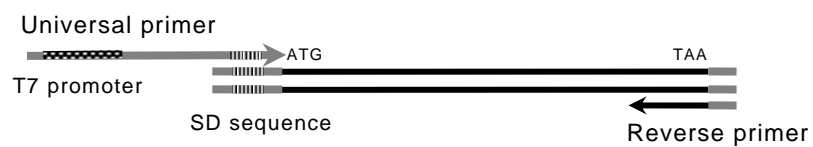



図 2) 2 段階 PCR によるテンプレート DNA の調製

5-2. タンパク質合成反応

タンパク質の合成反応，精製，検出などの実験操作に慣れていない場合は，キットに添付されているポジティブコントロール（Temp. DHFR）を用いて，合成・簡易精製の一連の操作を確認されることを推奨します。（第 6 章を参照してください）
ヌクレアーゼの混入を避けるため，手袋，マスクなどを着用の上，ヌクレアーゼフリーのチップ，チューブを使用してください。

1. 必要な本数の Sol. A および Sol. B を氷上で融解します。反応液中の酵素が失活する可能性があるので，融解後の再凍結は避けてください。
2. 新しい反応チューブを用意し，氷上で以下のように反応液を調製します。

		96 / mini	standard
□	Nuclease-free Water	µl	µl
□	Sol. A	25 µl	500 µl
□	Sol. B	10 µl	200 µl
□	Template DNA	µl*[1]	µl*[2]
	Total	50 µl	1000 µl

*1; 1 pmol PCR product or 0.5 µg plasmid DNA

*2; 20 pmol PCR product or 10 µg plasmid DNA

3. 泡立てないように混ぜ，軽く遠心して反応液をチューブの底に集めます。
4. 37 °C で 1 時間反応します。
5. 反応チューブを氷上に戻します。

5-3. 合成タンパク質の簡易精製

合成したタンパク質の精製法について，すでに報告がある場合はその方法に従って精製してください。精製法が不明な場合，合成したタンパク質の分子量が 100 kDa 以下のタンパク質については，以下に示す簡易精製法で精製できる場合があります。

5-3-1. 簡易精製に必要な試薬および器具

Ni-NTA Agarose (QIAGEN)
ナノセップ　100k (Pall)
マイクロバイオスピンエンプティカラム (BIO-RAD)
Vortex Mixer

5-3-2. 方法 1（**96 / mini**）

1. 反応液に等量の水（50 μl）を加えます。
（この操作は，以下の操作を行ないやすくするためで必須ではありません。）
2. 希釈した反応液をナノセップ100kの上部カップに入れます。
3. 1,500x*g* で 30 分間遠心します（4 °C）。
4. 透過液を新しいチューブに移します。
（反応液と樹脂とをよく攪拌させるため，2ml 丸底チューブの使用を推奨します。）
5. Ni-NTA Agarose を 1/10 量（10 μl）加えます。
6. 4 °C で1時間攪拌します。
7. マイクロバイオスピンエンプティカラムを新しい 1.5 ml チューブに載せます。
8. 反応液と樹脂の混合液をカラムに入れます。
9. 1,500x*g* で 1 分間遠心します（4 °C）。
10. 透過液を回収します。

5-3-3. 方法 2（**96 / mini**）

この方法は，合成したタンパク質が方法 1 で確実に回収される場合に推奨します。

1. 反応液に等量の水（50 μl）を加えます。
（この操作は，以下の操作を行いやすくするためで必須ではありません。）
2. 希釈した反応液を新しいチューブに移します。
（反応液と樹脂とをよく攪拌させるため，2ml 丸底チューブの使用を推奨します。）
3. Ni-NTA Agarose を 1/10 量（10 μl）加えます。
4. 4 °C で1時間攪拌します。
5. 反応液と樹脂の混合液をナノセップ100kの上部カップに入れます。
6. 1,500x*g* で 30 分間遠心します（4 °C）。

7. 透過液を回収します。

5-3-4. 方法 3（standard）

1. 反応液（1 ml）を 200 µl ずつ分注します。
2. 分注した反応液をそれぞれナノセップ100kの上部カップに入れます。
3. 1,500x*g* で 30-60 分間遠心します（4 °C）。
4. 透過液を 1 本の新しいチューブにまとめます。
（反応液と樹脂とをよく攪拌させるため，2ml 丸底チューブの使用を推奨します。）
5. Ni-NTA Agarose を 1/10 量（100 µl）加えます。
6. 4 °C で1時間攪拌します。
7. マイクロバイオスピンエンプティカラムを新しい 2 ml チューブに載せます。
8. 反応液と樹脂の混合液をカラムに入れます。
9. 1,500x*g* で 3 分間遠心します（4 °C）。
10. 透過液を回収します。

5-4. 合成タンパク質の解析

合成したタンパク質は，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）後のタンパク質染色やウェスタンブロッティング，あるいは酵素活性測定などにより検出，解析してください。また，RI 標識アミノ酸存在下で合成反応を行なった場合は，電気泳動後，フルオログラフィーにより検出可能です。

以下に，SDS-PAGE による検出法の一例を示します。

1. 反応液サンプルを SDS-PAGE ローディングバッファーと混合します。
2. 熱処理を行ないます。
3. サンプルをゲルのウェルに入れ，電気泳動を行ないます。
4. 泳動終了後，クマシーブリリアントブルー染色，銀染色，蛍光色素染色などによりタンパク質のバンドを検出します。

合成量は，目的のタンパク質によって異なります。合成量が低く，タンパク質が検出できない場合は，トリクロロ酢酸やアセトンなどを用いてサンプルを濃縮後，電気泳動してください。
使用する染色法，染色キットによっては，反応液中に存在する RNA によりタンパク質の染色が阻害される場合があります。特に，20-30 kDa 付近は反応液中の tRNA により染色されにくい場合があります。その場合は，タンパク質合成後に，RNase 処理を行なってください。その場合， 50 µl の反応液に対し，市販の RNaseA を 3.75 µg 加えて 37 °C で 15 分間反応させてください。

6. DHFR の合成と簡易精製（ポジティブコントロール）

ポジティブコントロールとしてキットに含まれている DHFR (Dihydrofolate Reductase; ジヒドロ葉酸還元酵素）の合成，簡易精製および SDS-PAGE による検出法を以下に示します。

1. Sol. A，Sol. B および Temp. DHFR を氷上で融解します。
2. 新しい反応チューブを用意し，氷上で以下のように反応液を調製します。

Nucleas e-free Water	12.5 µl	
Sol. A	25 µl	
Sol. B	10 µl	
Temp. DHFR	2.5 µl	(0.5 µg)
Total	50 µl	

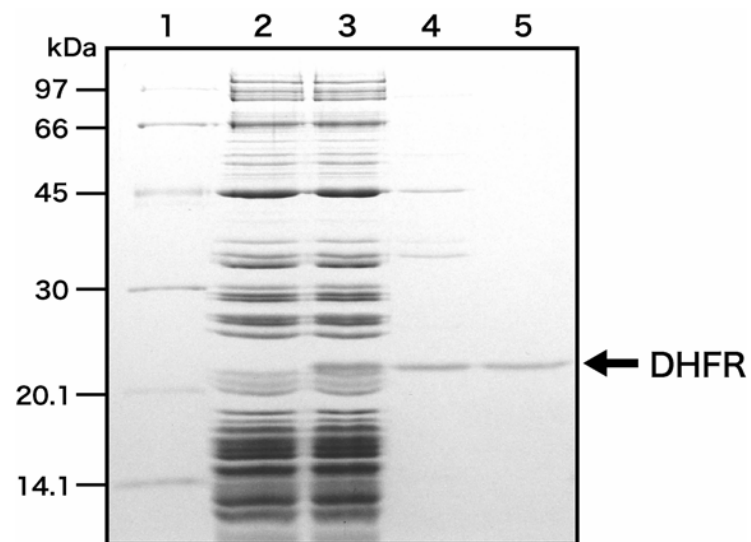
3. 泡立てないように混ぜ，軽く遠心して反応液をチューブの底に集めます。
4. 37 °C で 1 時間反応します。
5. 反応チューブを氷上に戻します。
6. 反応液に等量の水（50 µl）を加えます。
7. 希釈した反応液をナノセップ100kの上部カップに入れます。
8. 1,500x*g* で 30 分間遠心します（4 °C）。
9. 透過液を新しい 2ml 丸底チューブに移します。
10. Ni-NTA Agarose を 1/10 量（10 µl）加えます。
11. 4 °C で1時間攪拌します。
12. マイクロバイオスピンエンプティカラムを新しい 1.5 ml チューブに載せます。
13. 反応液と樹脂の混合液をカラムに入れます。
14. 1,500x*g* で 1 分間遠心します（4 °C）。
15. 透過液を回収します。
16. ステップ 6，8，15 後の各サンプル 10 µl（合成反応液 5 µl に相当します）に SDS-PAGE ローディングバッファーを加えます。
17. 95 °C で 5 分間熱処理を行ないます。
18. サンプルを 12.5%ゲルを用いて電気泳動します。
19. 泳動終了後，ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色し，タンパク質のバンドを検出します。（図 3）

1. 分子量マーカー
2. 合成後（テンプレートDNAなし）
3. 合成後
4. UF膜透過液
（リボソーム除去後）
5. Ni-NTA Agarose除去後
（ヒスチジンタグ付因子除去後）

図 3） DHFR（ポジティブコントロール）の合成および簡易精製の結果

7. トラブルシューティング

7-1. テンプレート DNA の調製

・1 段階目の PCR で目的の長さの増幅産物が得られません。

プライマーが最適ではない。

→ プライマーの設計を再度行なってください。2 段階目に使用する Forward プライマー（Univ. Primer）の配列は 8 ページに記載してあります。

PCR の反応条件が最適ではない。

→ アニーリング温度，伸長時間などを再検討してください。

→ DMSO などの添加剤の反応液への添加も効果がある場合があります。

・2 段階目の PCR で目的の長さの増幅産物が得られません。

プライマーが最適ではない。

→ プライマーの設計を再度行なってください。2 段階目に使用する Forward プライマー（Univ. Primer）の配列は 8 ページに記載してあります。

→ 2 段階 PCR ではなく 1 段階の PCR をお試しください。その場合は，以下の Forward プライマーを合成し使用してください。

5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCC
CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA-ATG-$N_{14\text{-}20}$-3'

PCR の反応条件が最適ではない。

→ アニーリング温度，伸長時間などを再検討してください。

→ DMSO などの添加剤の反応液への添加も効果がある場合があります。

7-2. PURESYSTEM でのタンパク質合成

・ポジティブコントロール（DHFR）が合成できません。

キットの構成成分が失活している。

→ キットは-80 °C で保存してください。また，融解後の再凍結は避けてください。

ヌクレアーゼが混入している。

→ ヌクレアーゼが混入しないように，手袋，マスクをして実験を行なってください。

・ポジティブコントロールは合成されますが，目的タンパク質が合成されません。

テンプレート DNA の配列に誤りがある。

→ テンプレート DNA の配列を確認してください。また，プラスミド DNA を使用する場合，T7 プロモーター配列，リボソーム結合部位（SD 配列），転写ターミネーター配列を含むベクターを使用してください。

テンプレート DNA の純度，濃度が適切ではない。

→ テンプレート DNA の純度，濃度を確認してください。また，市販のプラスミド DNA 精製キットのなかで，**PURESYSTEM** のテンプレート DNA の調製には適さないものが報告されています。詳細は，テクニカルサポートにお問い合わせください。

ヌクレアーゼが混入している。

→ ヌクレアーゼが混入しないように，手袋，マスクをして実験を行なってください。

転写産物が二次構造を形成して翻訳されない。

→ 二次構造を形成しないような変異を導入してください。もしくは，5'側にタグ配列を導入してください。

目的のタンパク質（転写産物）が転写・翻訳反応を阻害している。

→ キットに添付されているポジティブコントロール（Temp. DHFR）を同じ反応液で合成し， DHFR の合成が阻害されるか確認してください。

・目的タンパク質は合成されますが合成量が低い。

テンプレート DNA の純度，濃度が適切ではない。

→ テンプレート DNA の純度，濃度を確認してください。また，市販のプラスミド DNA 精製キットのなかで，**PURESYSTEM** のテンプレート DNA の調製には適さないものが報告されています。詳細は，テクニカルサポートにお問い合わせください。

ヌクレアーゼが混入している。

→ ヌクレアーゼが混入しないように，手袋，マスクをして実験を行なってください。

転写産物が二次構造を形成して翻訳を抑制している。

→ 二次構造を形成しないような変異を導入してください。もしくは，5'側にタグ配列を導入してください。

・目的タンパク質が合成されますが不溶化しています。

目的タンパク質が凝集している。

→ 合成時の温度を 37 °C より低い温度で行なうと，可溶性になる場合があります。

8．お問い合わせ

技術，製品について不明な点がございましたら，下記までお問い合わせください。

info@biocomber.co.jp

製品の最新情報につきましては下記ホームページをご参照ください。

www.biocomber.co.jp